

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): WATANABE, Eijiro; OEDA, Kenji

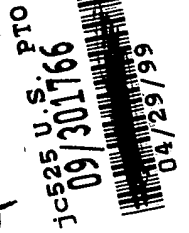
Application No.:

Group: 11649

Filed: April 29, 1999

Examiner: Zaphmont

For: RAFFINOSE SYNTHASE GENES AND THEIR USE



LETTER

Assistant Commissioner for Patents
Box Patent Application
Washington, D.C. 20231

April 29, 1999
0020-4559P

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55(a), the applicant hereby claims the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	120550/1998	04/30/98
JAPAN	120551/1998	04/30/98
JAPAN	345590/1998	12/04/98
JAPAN	351246/1998	12/10/98

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. 1.16 or under 37 C.F.R. 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By: 

GERALD M. MURPHY, JR.

Reg. No. 28,977

P. O. Box 747

Falls Church, Virginia 22040-0747

Attachment
(703) 205-8000
/aam

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

B.S. K.B.
Eijiro NATANABE et al.
4-29-99
20-4559P
1084

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年12月 4日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第345590号

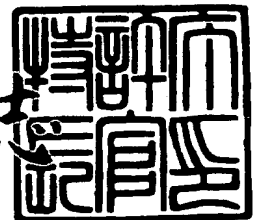
出 願 人
Applicant (s):

住友化学工業株式会社

1999年 3月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3019230

【書類名】 特許願

【整理番号】 P149842

【提出日】 平成10年12月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子

【請求項の数】 17

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
社内

 【氏名】 渡辺 英二郎

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
社内

 【氏名】 大江田 憲治

【特許出願人】

 【識別番号】 000002093

 【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

 【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

 【識別番号】 100093285

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 久保山 隆

 【電話番号】 06-220-3404

【選任した代理人】

 【識別番号】 100094477

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 神野 直美

 【電話番号】 06-220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【プールの可否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号236から2584までの塩基で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する蛋白質をコードするDNAからなるラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 2】

配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 3】

配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号236から2584までの塩基で表される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 4】

請求項 1～3 記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有するDNA。

【請求項 5】

ハイブリダイゼーション法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを検出する方法であって、請求項 4 記載のDNAを標識しこれをプローブに用いて前記DNAを検出することを特徴とする方法。

【請求項 6】

ポリメラーゼチェーンリアクション法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを増幅する方法であって、請求項 1～3 記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いて前記DNAを増幅することを特徴とする方法。

【請求項 7】

ラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法であって、請求項 5 記載の方法により

ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを検出し該DNAを回収する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 8】

ラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法であって、請求項 7 記載の増幅方法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを増幅し該DNAを回収する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1～3 記載のラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAまたは請求項 4 記載のDNAと、宿主細胞においてプロモーター活性を示すDNAとが連結されてなるDNA。

【請求項 10】

請求項 1～3 記載のラフィノース合成酵素遺伝子または請求項 4 もしくは 9 記載のDNAを有するベクター。

【請求項 11】

請求項 1～3 記載のラフィノース合成酵素遺伝子が宿主の細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項 12】

請求項 9 記載のDNAが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項 13】

請求項 10 記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項 14】

宿主細胞が微生物である請求項 11～13 記載の形質転換体。

【請求項 15】

宿主細胞が植物細胞である請求項 11～13 記載の形質転換体。

【請求項 16】

請求項 11～15 記載の形質転換体を培養しラフィノース合成酵素を産生させることを特徴とするラフィノース合成酵素の製造方法。

【請求項 17】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラフィノース合成酵素遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

ラフィノース類オリゴ糖は、一般式として α -D-ガラクトピラノシル-(1 \rightarrow 6)
n- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 2)- β -D-フルクトフラノシドで示されるショ糖
の誘導体であり、n=1の場合にはラフィノース、n=2の場合にはスタキオース、n=3
の場合にはベルバスコース、n=4の場合にはアジュコースと呼ばれる。

ラフィノース類オリゴ糖は、食品中に適量存在すると腸内細菌フローラの状態
を健全にする効果を示すことが知られており、適当量のラフィノースをヒトが摂
取した時に便性の改善、ミネラルの吸収促進、免疫賦活化等の効果も報告されて
いる。このため、ラフィノース類オリゴ糖は機能性食品素材として一部の食品に
添加され、特定保健用食品分野において利用され始めている。また、ラフィノー
スは臓器保存液の成分としてなど医療分野においても利用されている。

このようなラフィノース類オリゴ糖は、多くの植物においてショ糖を初発とす
るラフィノース類オリゴ糖生合成系により生成される。この生合成系は、通常、
ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基に、
ガラクチノール由来のガラクトシル基が α (1 \rightarrow 6)結合によって順次付加される反
応により構成されている。該生合成系の最初の段階において、ショ糖分子中のD-
グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基に、ガラクチノール由
来のD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させ
る反応に関与する酵素がラフィノース合成酵素である。該酵素は前記生合成系に
おける律速段階となっていることが示唆されており、該酵素がラフィノース類オ
リゴ糖の生合成系の制御に重要である。

そこで、植物のラフィノース生成量を増加または減少させるために、植物にお
けるラフィノース類オリゴ糖の生合成系を制御するには、ラフィノース合成酵素
遺伝子を利用して植物中のラフィノース合成酵素の発現量や活性を制御する方法

が有効である。しかしながら、このような方法に使用できるラフィノース合成酵素遺伝子の取得は未だ十分とはいえない。

【0003】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、アカザ科植物からラフィノース合成酵素遺伝子を見出し、本発明に至った。

すなわち、本発明は、配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号236から2584までの塩基で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する蛋白質をコードするDNAからなるラフィノース合成酵素遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNA、該DNAをプローブに用いるラフィノース合成酵素遺伝子の検出方法、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いるラフィノース合成酵素遺伝子の増幅方法、前記検出方法または前記増幅方法を利用するラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法、本発明遺伝子を含むDNAと、宿主細胞においてプロモーター活性を示すDNAとが連結されてなるDNA、本発明遺伝子が宿主の細胞に導入されてなる形質転換体、該形質転換体を培養しラフィノース合成酵素を産生させることを特徴とするラフィノース合成酵素の製造方法、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素を提供するものである。

【0004】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。なお、以下に記述された遺伝子工学的な方法は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6、「Current Protocols In Molecular Biology」 (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X、Current Protocols In Protein Science (1995), John Wiley & So

ns, Inc. ISBN0-471-11184-8等の記載に準じて実施可能である。

【0005】

本発明遺伝子は、ビート等のアカザ科植物から得ることのできるラフィノース合成酵素をコードする遺伝子であり、具体的には例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号2に示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子等をあげることができる。

【0006】

本発明遺伝子は、例えば、ビート等のアカザ科植物から下記の方法により得ることができる。

例えば、ビート (*Beta vulgaris*) 等のアカザ科植物の組織を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢などを用いて物理的に磨砕することにより細かい粉末状の組織片とし、該組織片から通常の方法によりRNAを抽出する。該抽出操作には、市販のRNA抽出キットを利用することができる。得られたRNA抽出液からエタノール沈澱によりRNAを回収し、このRNAから通常の方法によりポリA鎖を有するRNAを分画する。該分画操作には、市販のOligo dTカラムを利用することができる。このようにして得られたポリA鎖を有するRNAから通常の方法によりcDNAを合成する。該合成操作には、市販のcDNA合成キットを利用することができる。前記cDNAを鋳型として、配列番号2で示される塩基配列を基にして設計され化学合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCRを行なうことにより、DNAを増幅する。ここでプライマーとしては、例えば、下記リスト1に示されるプライマー1と2をあげることができ、該プライマーを用いてビート由来のcDNAを鋳型としてPCRを行い、本発明遺伝子である「配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子」、「配列番号2で示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子」を取得することができる。この際に用いられるプライマーは、目的に応じて配列番号2で示される塩基配列を基にして設計し合成することができる。例えば、「配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号236から2584までの塩基で表される塩基配列からなるラフィノース合成酵素遺伝子」のDNA（以下、本DNAと記す。）を増幅するには、下記リス

ト1のプライマー3と4に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成しプライマーに用いると良い。

増幅されたDNAは、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてクローニングすることができる。TAクローニングキット (Invitrogen社) 等の市販のクローニングキットや、pBluescriptII (Stratagene社の) 等の市販のプラスミドベクターなどを用いてクローニングしてもよい。クローニングされたDNAの塩基配列の確認は、F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson 著、Proceedings of National Academy of Science U.S.A. (1977), 74, 5463頁-5467頁等に記載されるダイデオキシターミネーティング法により行なうことができる。例えば、市販のパーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitなどを利用すると良い。

【0007】

(リスト1)

プライマー1	CTACCAAATT CCACAACCTTA AAGTTCA	27mer
プライマー2	GGAATAATAA GCTTCACACA TACTGTACTC TC	32mer
プライマー3	ATGGCTCCAA GCTTTAGCAA GGAAAAATCC	30mer
プライマー4	TCAAAATAAG TACTCAACAG TGGTAAAACC	30mer

【0008】

次いで、前記のようにして取得することができる本DNAを標識しこれをハイブリダイゼーション法におけるプローブとして例えばアカザ科植物由来のDNAにハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するDNAを検出することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを検出することができる。

アカザ科植物由来のDNAとしては、例えば、ビート等のアカザ科植物のcDNAライブラリーやgenomicDNAライブラリー等を使用することができる。このような遺伝子ライブラリーには、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記

載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーを用いることができる。

ハイブリダイゼーション法としては、ブランクハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションをあげることができ、ライブラリーの作製に用いられたベクターの種類に応じて選択する。具体的には、使用されるライブラリーがファージベクターを用いて構築された場合には、まずライブラリーのファージを適当な宿主微生物と感染可能な条件下で混合して形質転換体を得た後、該形質転換体を軟寒天培地と混合し、寒天培地上にまく。その後適当な大きさのブランクが現れるまで37℃で培養を行う。また、使用されるライブラリーがプラスミドベクターで構築された場合には、まずライブラリーのプラスミドを適当な宿主微生物に導入し、形質転換体を得る。得られた形質転換体を適当に希釈して寒天培地にまき、適当な大きさのコロニーが現れるまで37℃で培養を行う。いずれのライブラリーの場合も上記の培養後、寒天培地の表面にメンブレンフィルターをのせ、ファージまたは形質転換体をメンブレンに転写する。このメンブレンをアルカリによる変性処理後、中和処理し、例えばナイロンメンブレンの場合には該メンブレンに紫外線を照射することにより、ファージまたは形質転換体のDNAをメンブレン上に固定する。次にこのメンブレンについて、通常の方法により標識された本DNAをプローブとして用いてハイブリダイゼーション法を行う。この方法については、例えば、D M Glover編「DNA cloning, a practical approach.」IR L PRESS (1985) ISBN 0-947946-18-7を参考にするといよい。ハイブリダイゼーションを行う際の試薬及び温度条件は多種存在するが、一般的には例えば、プレハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーション溶液[6×SSC(0.9M NaCl, 0.09Mクエン酸)、0.1~1(w/v)%SDS、100μg/ml変性サケ精巢DNA]にメンブレンを浸して65℃で1時間インキュベートする。次に、ここへ標識された本DNAを加えて混合し、42~68℃で4~16時間保温することによりハイブリダイゼーションを行う。尚、本発明において「ストリンジェントな条件」としては、前記のハイブリダイゼーションにおいて、例えば、65~68℃にて保温するような条件をあげることができる。ハイブリダイゼーション終了後メンブレンを取り出し、これを0.1~1(w/v)%SDSを含む2×SSCで洗浄し、さらに0.1~1(w/v)%SDSを含む0.2×SSC

ですすいだ後乾かす。このメンブレンを、例えば、オートラジオグラフィーなどにより解析してメンブレン上のプローブの位置を検出することにより、用いたプローブと相同性のある塩基配列を有するDNAのメンブレン上の位置を検出することができる。このようにして検出されたDNAのメンブレン上の位置に相当するクローンをもとの寒天培地上で特定しこれを釣菌することにより、当該DNAを有するクローンを単離することができ、さらに、同様の検出操作を繰り返すことで当該DNAを有するクローンを純化することができる。

また、市販のGibcoBRL社のGENE TRAPPER cDNA Positive Selection Systemキットの様な検出の方法を用いることもできる。この方法では、まず一本鎖化したDNAライブラリーとビオチン化した本DNA（プローブ）とをハイブリダイズさせた後、これにストレプトアビジン結合マグネットビーズを加えて混合し、この混合物からストレプトアビジン結合マグネットビーズを磁石で回収することで、本DNA、ビオチンおよびストレプトアビジンを介して該ビーズに結合した1本鎖DNA、すなわち、用いたプローブと相同性のある塩基配列を有する1本鎖DNAを回収する。尚、回収された1本鎖DNAは適当なオリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼを反応させることにより2本鎖化することができる。

【0009】

上記のように本DNAとハイブリダイズするDNAをアカザ科植物由来の遺伝子ライブラリーのDNAから検出し、当該DNAを保有するクローンを純化して該クローンからファージまたはプラスミドDNAを単離することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを取得することができる。このようにして得られたDNAについて通常の方法により制限酵素地図を作成するかまたは塩基配列を決定することにより、本発明遺伝子を含むDNAを確認することができる。例えば、決定された塩基配列にコードされるアミノ酸配列が、配列番号1で示されるアミノ酸配列の103番目から208番目までのアミノ酸からなるアミノ酸配列と75%以上の相同性を有すること、配列番号1で示されるアミノ酸配列の255番目から271番目までのアミノ酸からなるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有すること、配列番号1で示されるアミノ酸配列の289番目から326番目までのアミノ酸からなるアミノ酸配列と70%以上の相同性を有すること、配列番号1で示されるアミ

ノ酸配列の610番目から696番目までのアミノ酸からなるアミノ酸配列と70%以上の相同性を有すること等から、本発明遺伝子であることを確認することができる。尚、ここで述べる相同性とは、比較する2つのアミノ酸配列間に類似性の見られる領域において、該領域全体のアミノ酸数に対して、一致するアミノ酸が占める割合のことである。ここで、類似性の見られる領域のアミノ酸数は多い方が好ましい。例えば、GENETIX(ソフトウェア開発株式会社製)などの遺伝子解析ソフトを用いることにより評価することができる。

さらに、このようにして得られる本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNAをプローブとして上記と同様に所望の生物由来のDNAにハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するDNAを検出することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを検出する(以下、本発明検出方法と記す。)ことができる。

【0010】

本発明遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いるPCR法により、所望の生物由来のDNAからラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを増幅する(以下、本発明増幅方法と記す。)ことが可能である。

具体的には、例えば、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを設計し、通常の合成方法によりこれを化学合成する。オリゴヌクレオチドの長さとしては、一般的に、アニーリングの特異性が確保される点からは塩基数が多い方がよく、プライマー自身が高次構造を取り易くアニーリング効率が悪くなる恐れがある点や合成後の精製時に煩雑な操作が必要となる点からは塩基数が多すぎない方がよく、通常、塩基数が15以上50以下が好ましい。コドン表(図1)に基づき、1つのアミノ酸をコードしうるコドンのバリエーションに応じてプライマーの特定の位置の残基を数種類の塩基の混合物とするミックスプライマーを合成することもできる。また、例えば、複数種の塩基と対合できるイノシンなどの塩基を数種類の塩基の混合物の代わりに用いることもできる。尚、ここで、2本鎖DNAからなる本発明遺伝子のコーディング鎖と同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをセンスプライマー、該コーディング鎖の塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマーと呼ぶ。

本発明遺伝子のコーディング鎖の5'上流側の塩基配列を有するセンスプライマーと、3'下流側の塩基配列と相補的な塩基配列を有するアンチセンスプライマーを組み合わせて用いて、例えば、遺伝子ライブラリー、ゲノムDNAまたはcDNAを鋳型としてPCR反応を行いDNAを増幅する。ここで用いられる遺伝子ライブラリーとしては、例えば、ビートなどのアカザ科植物等のcDNAライブラリーやgenomicDNAライブラリー等をあげることができる。該遺伝子ライブラリーとしては、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーを用いることができる。ゲノムDNAまたはcDNAとしては、例えば、目的のアカザ科植物等から調製されたgenomicDNAやcDNAをあげることができる。このようにして増幅されたDNAは通常の電気泳動法により確認することができ、該DNAは、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてクローニングすることができる。該DNAについて通常の方法により制限酵素地図を作成するかまたは塩基配列を決定することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子またはその一部を含むDNAを確認することができる。該DNAがラフィノース合成酵素遺伝子の一部を含む場合は、その塩基配列に基づき、該塩基配列の5'末端より上流の塩基配列を含むDNAまたは該塩基配列の3'末端より下流の塩基配列を含むDNAの増幅をPCR法で行うことができる。すなわち、上記のようにして得られたDNAの塩基配列に基づいて、5'末端側上流部分の増幅にはアンチセンスプライマーを、3'末端側下流部分の増幅にはセンスプライマーをそれぞれ設計し合成する。これらのプライマーを用いて、例えば、Clontech社のMarathon Kit等の市販のキットを用いてRACE法を行うことにより、ラフィノース合成酵素遺伝子の既得部分の5'末端より上流または3'末端より下流の塩基配列を明らかにすることができる。このようにして明らかにされた塩基配列に基づいて新たにプライマーを合成し、再度PCRを行うことにより完全長のラフィノース合成酵素遺伝子を取

得することができる。

【0011】

上述の本発明検出方法を植物、例えばアカザ科植物の遺伝子の解析に利用してもよい。具体的には、植物、例えばアカザ科植物ゲノムDNAを、例えば、渡辺格監修、杉浦昌弘編集：「クローニングとシーケンス(植物バイオテクノロジー実験マニュアル)」、農村文化社、東京(1989)などに記載された通常の方法に従って調製し、適当な少なくとも数種類の制限酵素で切断し、電気泳動した後、泳動されたDNAを通常の方法に従ってフィルターにブロットニングする。このフィルターに本DNAから通常の方法で調製されたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行ない、プローブがハイブリダイズするDNAを検出する。検出されたDNAの長さを特定植物種の異なる品種について比較し、その長さの違いから、品種間のラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質の差を解析することができる。また、上記の方法により検出されたDNAの長さを遺伝子組換え植物と同種の非遺伝子組換え植物とで比較したときに、遺伝子組換え植物において非遺伝子組換え植物よりもハイブリダイズするバンドが数多くまたは濃く検出された場合、該植物が遺伝子組換え植物であると判別することができる。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコル」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、90-94頁に記載されるRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法に準じて行なうことができる。

【0012】

また、本発明増幅方法をアカザ科植物等の遺伝子の解析に利用してもよい。具体的には、例えば、アカザ科植物等から調製した植物ゲノムDNAを鋳型として、本発明増幅方法を行ない、DNAを増幅させる。増幅されたDNAをホルムアルデヒド溶液と混合し、85℃で5分間加熱変性処理を行った後、氷上で急冷する。このサンプルをグリセロールを0(v/v)%または10(v/v)%含む、例えば6(w/v)%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動に供する。この電気泳動には市販のSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)用の電気泳動装置を用いることができ、例えば5℃、25℃、37℃等にゲルの温度を一定に保って電気泳動を行なう。電気泳動したゲルから、例えば、市販の試薬による銀染色法等の方法によりDNAを検出

する。検出されたDNAの電気泳動における挙動の品種間の差からラフィノース合成酵素遺伝子内の変異を検出し、該変異に基づいて生じる、ラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質における品種間の差を解析する。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコル」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、141-146頁に記載されるSSCP法に準じて行うことができる。

【0013】

上述のアカザ科植物の遺伝子解析法は品種のラフィノース類オリゴ糖生合成に伴う表現形質の差の解析に有用なだけでなく、アカザ科植物の品種の作出の際に目的の形質を持つクローンの選択をする際にも有用である。

同様に組換え体植物を利用して品種作出を行う場合、作出したクローンが組換え体植物由来の形質を保持しているか否かの判別にも有効である。

【0014】

本発明遺伝子を宿主の細胞で発現させるには、本発明遺伝子がプロモーターと連結されてなるDNA（以下、本発明発現DNAと記す。）を利用するとよい。該DNAにおいてプロモーターは、該DNAが導入され形質転換される宿主の細胞内で機能可能なものであれば特に制限はない。例えば、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーター、tacプロモーター等の大腸菌内で機能可能な合成プロモーター、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（ADH）プロモーター、アデノウイルス・メジャーレート（Ad.ML）プロモーター、SV40の初期プロモーター、バキュロウイルスプロモーターなどがあげられる。また、宿主が植物である場合には、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子(OCS)プロモーターなどのT-DNA由来の構成型プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の19S及び35Sプロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ(CHS)遺伝子のプロモーター、Pathogenesis-related protein(PR)遺伝子のプロモーターなどの誘導プロモーターなどをあげることができる。また、特定の植物組織で特異的に発現するようなプロモーター、例えば、ダイズ由来種子貯蔵蛋白質

グリシニン遺伝子のプロモーターを持つベクターpSUM-GY1 (特開平06-189777) などを使用することもできる。

さらに、本発明発現DNAにターミネーターを連結させてもよい。この場合、発現させようとするラフィノース合成酵素遺伝子の下流にターミネーターを有するように連結すると一般的によい。用いられるターミネーターは、形質転換される宿主の細胞内で機能可能なものであれば特に制限はないが、例えば宿主が植物の場合には、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)ターミネーターなどのT-DNA由来の構成型ターミネーター、ニンニクウイルスGV1、GV2のターミネーターなどの植物由来のターミネーターなどをあげることができる。

【0015】

かかる本発明発現DNAを通常の遺伝子工学的方法に準じて宿主の細胞に導入することにより形質転換体を得られる。尚、宿主の細胞に導入するための形質転換方法に応じて、必要であれば、本発明発現DNAを適当な選抜マーカー遺伝子を有するベクターに挿入して使用するとよい。

本発明発現DNAが挿入されたベクターは、例えば、宿主が微生物の場合には、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の手段により微生物に導入することができ、該ベクターにより形質転換された微生物は抗生物質耐性や栄養要求性等の選抜マーカーにより選抜される。選抜された微生物、例えば形質転換大腸菌などで誘導型のプロモーター、例えばtacプロモーターなどの下流に本発明遺伝子を翻訳可能な形で結合してある場合には通常の培養、誘導条件下で本発明遺伝子から翻訳産物を発現させ、ペプチド、あるいは蛋白質として回収することが可能である。このようにして調製した翻訳産物は抗体を作製する際の抗原として用いることもでき、このようにして調製した抗体は例えば植物などの生物から調製した粗蛋白抽出物中における本発明遺伝子の翻訳産物の検出・定量に用いることもできる。

【0016】

又、例えば、宿主が植物の場合には、本発明発現DNAが挿入されたベクター

は、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917および特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887および特開平5-68575)、またはパーティクルガン方法(特開平5-508316および特開昭63-258525)などの通常的手段により植物細胞に導入することができ、該ベクターの導入により形質転換された植物細胞はカナマイシンまたはハイグロマイシン等の抗生物質耐性などの選抜マーカーにより選抜される。このようにして形質転換された植物細胞から、例えば内宮著、「植物遺伝子操作マニュアル(トランスジェニック植物の作り方)」1990年、講談社サイエンティフィック(ISBN4-06-153513-7)、27-55頁に記載される通常の植物細胞培養方法により形質転換植物を再生することにより形質転換体植物が得られる。さらに、得られた形質転換体植物から種子を得ることにより該形質転換体植物の増殖を行うこともできる。また、得られた形質転換体植物と非形質転換体植物とを交雑することで形質転換体の形質をもつ子孫植物を作成することもできる。

【0017】

アカザ科植物における遺伝子工学的方法は基本的に上記の一般的な手法が適用できる。具体的には、M. Mannerlof, S. Tuveesson, P. Steen, P. Tenning著、" Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate", *Euphytica* (1997), 94, 83頁-91頁やB. K. Konwar著、" Agrobacterium tumefaciens-Mediated Genetic Transformation of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.)" , *J. Plant Biochemistry & Biotechnology*(1994), 3, 37-41頁等に記載される遺伝子導入法を用いることができる。

【0018】

本発明遺伝子を上記のように植物、例えばアカザ科植物に導入し発現させることにより、植物におけるラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させることができ、植物のラフィノース類オリゴ糖含量が制御され得る。本発明遺伝子はとりわけ、遺伝子の相同性に基づいてアカザ科植物のラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させる、例えば相同組換えやアンチセンス技術、コサプレッション等の技術において有用である。

【0019】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例にのみ限定されるものではない。

【0020】

実施例1 (cDNAの作成)

ビート(Beta vulgaris: ハミング)の葉約2gを液体窒素で凍結し、乳鉢で粉碎した。Isogen(ニッポンジーン社)を20ml加え、さらに良くすりつぶした。該破砕物を遠心管に移し、4mlのクロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌した後、これを4℃で6, 500 x g、10分間遠心分離し、水層を回収した。回収された水層に10mlのイソプロパノールを加えて攪拌した後、4℃にて6, 500 x g 10分間遠心分離した。得られた沈殿を10mlの70%エタノールで洗浄した後、これを180 μ lのDEPC-処理済み滅菌水で溶解した。該溶解物を55℃で5分間おいた後、該溶解物に10 μ lの5M NaClを加えた。得られた溶液はBIOMAG mRNA PURIFICATION KIT(PerSeptive Biosystems社:Catalog No. 8-MB4003K)を用いて精製した。

得られたmRNA溶液に3M酢酸ナトリウムとエタノールを加え、RNAをエタノール沈澱し、これを回収した。回収されたRNAを70%エタノールで2回洗浄し、これを20 μ lの滅菌水に溶解し、cDNA合成に用いた。得られたRNAは260nmの吸光度を測定し、定量した。

cDNA合成には、Clontech社のSMART PCR cDNA Synthesis Kitを用い、すべての操作はキットに添付のプロトコールに従った。

【0021】

実施例2 (ラフィノース合成酵素遺伝子の塩基配列の解析)

下記リスト2で示される塩基配列の合成DNAプライマーを合成した。PCRは、Clontech社のAdvantage KlenTaq cDNA Kitを用いてパーキンエルマー社のGene Amp PCR Systems 2400とDNA Thermal Cycler Model 480で行なった。上記プライマーを用い、実施例1により得られたビートのcDNAを用いてPCR反応を行った。反応は94℃1分間、次いで50℃3分間、72℃3分間の保温を1サイクルとして、この反応を40サイクル行った。その結果、プライマー3-Fと8-RVの組み合わせから約0.3kbのバンドの増幅が、プライマー10-Fと6-RVの組み合わせから約0.6kbのバンド

の増幅が見られた。増幅されたDNAをTAクローニングキット(Invitrogen社)でクローニングし、パーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitを用いてシーケンス反応を行ない、ABI社373S DNA シーケンサーで塩基配列の解析を行った。その結果得られた塩基配列をもとにリスト3で示される塩基配列の合成DNAプライマーを作成し、実施例1で得られたビートのcDNAを用いて上記と同様のPCRを行った。その結果、最終的にビートのcDNAから配列番号2で示される塩基配列を有するDNAが得られた。

【0022】

(リスト2)

3-F 47mer

CGAGGIGGIT GICCICIGG ITTIGTIATI ATIGAIGAIG GITGGCA

8-RV 29mer

AT(T/C)TT(A/G)TCIA CIGCIA(A/G)(A/G)TC (T/C)TCCATIGT

10-F 38mer

GGIACITAIT GG(C/T)TICAIGG ITGICAIATG GTICAITG

6-RV 32mer

GGCCACATIT TIACIA(A/G)ICC IATIGGIGCI AA

【0023】

(リスト3)

Sb-1 26mer

ATCTATTTGT CATGACGATG ATCCGA

Sb-2RV 30mer

GGCCCTCATT CCCATATTGG GATGATCCTC

Sb-3RV 30mer

AAGCATGCCA AACATACACA TGCTCAACAG

Sb-4RV 30mer

AGACCCGGGG AAAGCTTTGG GGTACTACT

Sb-5 28mer

TGGATGGGAA ACTTTATACA CCCTGACT

Sb-6 28mer

GACATGTTCC CATCTACACA CCCTTGTC

Sb-7 30mer

CCAATTTATG TTAGTGATGT TGTTGGCAAG

Sb-8RV 26mer

TCGACTCCCA GGGTAGAATT GTCATC

【0024】

(配列の簡単な説明)

1. 配列番号1:

配列番号1に示される配列は、ビートより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子にコードされるラフィノース合成酵素蛋白質のアミノ酸配列を示す。

2. 配列番号2:

配列番号2に示される配列は、ビートより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子のcDNA塩基配列を示す。

3. リスト1:

リスト1に示される配列は、ラフィノース合成酵素遺伝子のcDNAの増幅に用いられるプライマーの塩基配列の一例を示す。プライマー1はビート由来ラフィノース合成酵素のcDNAの5'-末端に相当するセンスプライマー、プライマー2は3'-末端側に相当しアンチセンスプライマーである。目的に応じて適当にこれらの塩基配列の5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を加えることができる。

プライマー3はオープンリーディングフレームのN末端領域に相当するセンスプライマー、プライマー4はC末端領域に相当するアンチセンスプライマーである。

4. リスト2:

リスト2に示される配列は、ビートのラフィノース合成酵素遺伝子の解析の際に用いたプライマーの塩基配列を示す。Iで示した塩基はイノシンを合成に用いたことを示す。また、括弧で括られた塩基はこれらの混合物をDNA合成の際に用いたことを示す。なお、プライマー番号の後に記載の「RV」はこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

5. リスト3:

リスト 3 に示される配列は、ビートのラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列に基づいて合成されたプライマーである。プライマー番号の後に記載の「RV」はこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

【0025】

【発明の効果】

本発明により、ラフィノース合成酵素の植物における発現量や活性を変化させる技術に利用可能なラフィノース合成酵素遺伝子等を提供することが可能となる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Chemical Company Limited

<120> Raffinose synthetase genes

<130> P149842

<160> 2

<210> 1

<211> 783

<212> PRT

<213> Beta vulgaris L.

<400> 1

Met Ala Pro Ser Phe Ser Lys Glu Asn Ser Lys Thr Cys Asp Glu Val

5 10 15

Ala Asn His Asp Asp Cys Asn Thr Cys Pro Ile Ile Ser Leu Glu Glu

20 25 30

Ser Asn Phe Met Val Asn Gly His Val Ile Leu Ser Gln Val Pro Ser

35 40 45

Asn Ile Thr Ala Ile Ser Lys Met Gly Phe Asp Gly Leu Phe Val Gly

50 55 60

Phe Asp Ala Pro Glu Pro Lys Ala Arg His Val Val Ser Val Gly Gln

65 70 75 80

Leu Lys Gly Ile Pro Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp

85 90 95

Thr Thr His Trp Thr Gly Ser Asn Gly Arg Asp Leu Glu His Glu Thr

100	105	110
Gln Ile Leu Ile Leu Asp Lys Ser Asp Glu Gly Leu Gly Arg Pro Tyr		
115	120	125
Ile Val Ile Leu Pro Leu Ile Glu Gly Pro Phe Arg Ala Ser Leu Gln		
130	135	140
Pro Gly Ser Val Asp Asp Tyr Val Asp Ile Cys Val Glu Ser Gly Ser		
145	150	155
Thr Lys Val Val Gly Asp Ser Phe Arg Ala Val Leu Tyr Ile Arg Ala		
165	170	175
Gly Pro Asp Pro Phe Lys Leu Ile Lys Asp Thr Met Lys Glu Val Gln		
180	185	190
Ala His Leu Gly Thr Phe Lys Leu Leu Asp Asp Lys Thr Pro Pro Gly		
195	200	205
Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Lys		
210	215	220
Val Glu Pro Tyr Gly Val Trp Glu Gly Val Lys Gly Leu Val Glu Asn		
225	230	235
Gly Val Pro Pro Gly Leu Val Leu Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile		
245	250	255
Cys His Asp Asp Asp Pro Ile Thr Asp Gln Glu Gly Ile Asn Arg Thr		
260	265	270
Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Ile Lys Tyr Glu Glu Asn		
275	280	285
Phe Lys Phe Arg Asp Tyr Lys Ser Pro Asn Ile Met Gly His Glu Asp		
290	295	300
His Pro Asn Met Gly Met Arg Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys Glu Glu		
305	310	315
Phe Lys Thr Val Glu His Val Tyr Val Trp His Ala Phe Thr Gly Tyr		
325	330	335

Trp Gly Gly Val Arg Pro Asn Val Pro Gly Leu Pro Glu Ala Gln Val			
340	345	350	
Val Thr Pro Lys Leu Ser Pro Gly Leu Glu Met Thr Met Glu Asp Leu			
355	360	365	
Ala Val Asp Lys Ile Val Asn Asn Gly Ile Gly Leu Val Gln Pro Asp			
370	375	380	
Lys Ala Gln Glu Leu Tyr Glu Gly Leu His Ser His Leu Glu Asn Cys			
385	390	395	400
Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu Glu Met Met			
405	410	415	
Ala Glu Asp Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Lys Thr Tyr Tyr Lys			
420	425	430	
Ala Ile Thr Glu Ser Val Arg Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val Ile			
435	440	445	
Ala Ser Met Glu Gln Cys Asn Asp Phe Met Leu Leu Gly Thr Glu Thr			
450	455	460	
Ile Cys Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Pro Thr Asp Pro Ser			
465	470	475	480
Gly Asp Ile Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His			
485	490	495	
Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile His Pro Asp Trp			
500	505	510	
Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala Ala Ser			
515	520	525	
Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Val Val Gly Lys			
530	535	540	
His Asn Ile Pro Leu Leu Lys Arg Leu Val Leu Ala Asp Gly Ser Ile			
545	550	555	560
Leu Arg Cys Glu Tyr His Ala Leu Pro Thr Lys Asp Cys Leu Phe Val			

565	570	575
Asp Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn		
580	585	590
Lys Tyr Asn Gly Val Leu Gly Val Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp		
595	600	605
Ser Arg Glu Ser Arg Lys Asn Leu Cys Phe Ser Glu Tyr Ser Lys Pro		
610	615	620
Ile Ser Cys Lys Thr Ser Pro Lys Asp Val Glu Trp Glu Asn Gly His		
625	630	635
Lys Pro Phe Pro Ile Lys Gly Val Glu Cys Phe Ala Met Tyr Phe Thr		
645	650	655
Lys Glu Lys Lys Leu Ile Leu Ser Gln Leu Ser Asp Thr Ile Glu Ile		
660	665	670
Ser Leu Asp Pro Phe Asp Tyr Glu Leu Ile Val Val Ser Pro Met Thr		
675	680	685
Ile Leu Pro Trp Glu Ser Ile Ala Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn		
690	695	700
Met Leu Asn Ala Gly Gly Ala Val Lys Ser Leu Asp Ile Ser Glu Asp		
705	710	715
Asn Glu Asp Lys Met Val Gln Val Gly Ile Lys Gly Ala Gly Glu Met		
725	730	735
Met Val Tyr Ser Ser Glu Lys Pro Lys Ala Cys Arg Val Asn Gly Glu		
740	745	750
Asp Met Glu Phe Glu Tyr Glu Glu Ser Met Ile Lys Val Gln Val Thr		
755	760	765
Trp Asn His Asn Ser Gly Gly Phe Thr Thr Val Glu Tyr Leu Phe		
770	775	780
		783

<211> 2690

<212> DNA

<213> Beta vulgaris L.

<220>

<221> CDS

<222> (236)...(2587)

<400> 2

ctaccaaatt ccacaactta aagttcacct caatctttat tccatttttc ctcctaaac	60
ttcattgtta agattttgta attgaattca aattcttaat tctgaatttt gtcatttttt	120
ttgtggggat atttataact atcatattat ttgtgtagat cattctacaa aaaagagagt	180
gagttttttt agctcttatt tcctaagaaa ttaatagcaa aagttttgca taact atg	238

Met

gct cca agc ttt agc aag gaa aat tcc aag acg tgt gat gag gtt gca	286
Ala Pro Ser Phe Ser Lys Glu Asn Ser Lys Thr Cys Asp Glu Val Ala	

5

10

15

aac cat gat gat tgc aac acg tgt cca ata att tcc ttg gaa gaa tca	334
Asn His Asp Asp Cys Asn Thr Cys Pro Ile Ile Ser Leu Glu Glu Ser	

20

25

30

aac ttc atg gtg aat ggt cac gtg ata ttg tcc caa gtt cca tcc aac	382
Asn Phe Met Val Asn Gly His Val Ile Leu Ser Gln Val Pro Ser Asn	

35

40

45

atc acg gcc att agt aaa atg ggt ttt gat ggg ctt ttt gtg ggt ttt	430
Ile Thr Ala Ile Ser Lys Met Gly Phe Asp Gly Leu Phe Val Gly Phe	

50

55

60

65

gat gct cca gag ccc aag gcc cgg cac gtt gta tcc gtg ggc cag ctc	478
Asp Ala Pro Glu Pro Lys Ala Arg His Val Val Ser Val Gly Gln Leu	

70

75

80

aag gga att ccc ttc atg agt atc ttc agg ttc aag gta tgg tgg act	526
Lys Gly Ile Pro Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr	
85 90 95	
acc cat tgg act ggg tcc aat ggg cgg gac ctt gag cat gag acc caa	574
Thr His Trp Thr Gly Ser Asn Gly Arg Asp Leu Glu His Glu Thr Gln	
100 105 110	
att ctc atc ctt gat aag tca gat gaa ggt ttg ggc cgt ccc tat att	622
Ile Leu Ile Leu Asp Lys Ser Asp Glu Gly Leu Gly Arg Pro Tyr Ile	
115 120 125	
gtg atc ctc cca ttg atc gaa ggc cca ttt cgg gca tct ctc cag ccg	670
Val Ile Leu Pro Leu Ile Glu Gly Pro Phe Arg Ala Ser Leu Gln Pro	
130 135 140 145	
ggg tct gtt gat gac tat gtg gat ata tgt gtt gag agt ggg tcc act	718
Gly Ser Val Asp Asp Tyr Val Asp Ile Cys Val Glu Ser Gly Ser Thr	
150 155 160	
aaa gtt gtc gga gac tcg ttc cgg gct gtt ctt tat ata cgg gct ggg	766
Lys Val Val Gly Asp Ser Phe Arg Ala Val Leu Tyr Ile Arg Ala Gly	
165 170 175	
cct gac cca ttt aag tta att aaa gat aca atg aag gaa gtc caa gcc	814
Pro Asp Pro Phe Lys Leu Ile Lys Asp Thr Met Lys Glu Val Gln Ala	
180 185 190	
cat tta ggg act ttc aaa ctc tta gat gac aaa act cct cca gga ata	862
His Leu Gly Thr Phe Lys Leu Leu Asp Asp Lys Thr Pro Pro Gly Ile	
195 200 205	
gtg gac aag ttt gga tgg tgt aca tgg gat gca ttt tac ctc aaa gta	910
Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Lys Val	
210 215 220 225	
gag ccw tat ggt gtt tgg gaa gga gtt aaa gga ctc gtc gaa aac ggg	958
Glu Pro Tyr Gly Val Trp Glu Gly Val Lys Gly Leu Val Glu Asn Gly	

230	235	240	
gtc cca ccc ggt ctc gta ctc att gat gat ggg tgg caa tct att tgt			1006
Val Pro Pro Gly Leu Val Leu Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Cys			
245	250	255	
cat gac gat gat ccg att acc gac caa gaa ggg ata aac cgg act tct			1054
His Asp Asp Asp Pro Ile Thr Asp Gln Glu Gly Ile Asn Arg Thr Ser			
260	265	270	
gcc ggc gag caa atg cca tgt aga ttg atc aag tac gag gaa aac ttc			1102
Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Ile Lys Tyr Glu Glu Asn Phe			
275	280	285	
aag ttt agg gac tat aaa agc cca aat att atg ggc cat gag gat cat			1150
Lys Phe Arg Asp Tyr Lys Ser Pro Asn Ile Met Gly His Glu Asp His			
290	295	300	305
ccc aat atg gga atg agg gcc ttt gtt agg gac ctt aag gag gag ttc			1198
Pro Asn Met Gly Met Arg Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys Glu Glu Phe			
310	315	320	
aaa act gtt gag cat gtg tat gtt tgg cat gct ttt acg ggc tat tgg			1246
Lys Thr Val Glu His Val Tyr Val Trp His Ala Phe Thr Gly Tyr Trp			
325	330	335	
gga ggg gta agg ccc aat gtt cca ggc cta ccr gag gcc caa gta gta			1294
Gly Gly Val Arg Pro Asn Val Pro Gly Leu Pro Glu Ala Gln Val Val			
340	345	350	
acc cca aag ctt tcc ccg ggt ctt gag atg aca atg gaa gat cta gct			1342
Thr Pro Lys Leu Ser Pro Gly Leu Glu Met Thr Met Glu Asp Leu Ala			
355	360	365	
gtg gat aaa att gtt aat aat ggt att ggg ctt gtc cag cct gat aag			1390
Val Asp Lys Ile Val Asn Asn Gly Ile Gly Leu Val Gln Pro Asp Lys			
370	375	380	385
gcc caa gaa ctt tat gaa ggg ttg cat tct cat ttg gaa aat tgt ggg			1438

Ala Gln Glu Leu Tyr Glu Gly Leu His Ser His Leu Glu Asn Cys Gly	
390 395 400	
att gat gga gtc aaa gtt gat gtc atc cat ttg ttg gag atg atg gca	1486
Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu Glu Met Met Ala	
405 410 415	
gag gac tat gga gga aga gtt gaa cta gca aaa aca tac tat aag gca	1534
Glu Asp Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Lys Thr Tyr Tyr Lys Ala	
420 425 430	
ata aca gaa tca gtg cgt aag cat ttc aaa ggc aac ggt gtg att gct	1582
Ile Thr Glu Ser Val Arg Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val Ile Ala	
435 440 445	
agc atg gag cag tgc aac gat ttc atg ctc ctt ggt act gag acc att	1630
Ser Met Glu Gln Cys Asn Asp Phe Met Leu Leu Gly Thr Glu Thr Ile	
450 455 460 465	
tgt ctt ggt cgc gtt ggg gat gac ttt tgg cca act gat ccg tct gga	1678
Cys Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Pro Thr Asp Pro Ser Gly	
470 475 480	
gat ata aat ggt aca tat tgg ctc caa ggc tgt cat atg gtg cat tgt	1726
Asp Ile Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His Cys	
485 490 495	
gcc tac aat agc tta tgg atg gga aac ttt ata cac cct gac tgg gac	1774
Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile His Pro Asp Trp Asp	
500 505 510	
atg ttc caa tct aca cac cct tgt gct gaa ttt cat gct gca tct cgt	1822
Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala Ala Ser Arg	
515 520 525	
gcg att tct ggt gga cca att tat gtt agt gat gtt gtt ggc aag cat	1870
Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Val Val Gly Lys His	
530 535 540 545	

aac atc ccc ttg ctc aaa agg ctc gtc ttg gct gat ggt tcg atc ctt	1918
Asn Ile Pro Leu Leu Lys Arg Leu Val Leu Ala Asp Gly Ser Ile Leu	
550 555 560	
cgt tgc gag tac cat gca ctt cct act aag gat tgc cta ttt gta gat	1966
Arg Cys Glu Tyr His Ala Leu Pro Thr Lys Asp Cys Leu Phe Val Asp	
565 570 575	
cct ttg cac gat ggc aaa aca atg ctc aaa att tgg aac ctc aac aag	2014
Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn Lys	
580 585 590	
tac aat gga gtg ctt gga gtc ttc aat tgc caa gga gga ggg tgg agc	2062
Tyr Asn Gly Val Leu Gly Val Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp Ser	
595 600 605	
cgt gag tct cga aaa aat cta tgt ttc tca gag tat tca aaa cct att	2110
Arg Glu Ser Arg Lys Asn Leu Cys Phe Ser Glu Tyr Ser Lys Pro Ile	
610 615 620 625	
tcc tgc aag aca agt cca aaa gat gtt gaa tgg gag aac gga cac aag	2158
Ser Cys Lys Thr Ser Pro Lys Asp Val Glu Trp Glu Asn Gly His Lys	
630 635 640	
cca ttc ccc atc aaa gga gtg gaa tgt ttt gcc atg tac ttc acc aag	2206
Pro Phe Pro Ile Lys Gly Val Glu Cys Phe Ala Met Tyr Phe Thr Lys	
645 650 655	
gaa aaa aag cta atc ctc tca caa cta tct gac acc att gaa ata tca	2254
Glu Lys Lys Leu Ile Leu Ser Gln Leu Ser Asp Thr Ile Glu Ile Ser	
660 665 670	
ctt gat ccc ttc gat tac gag ctt att gta gtc tct ccg atg aca att	2302
Leu Asp Pro Phe Asp Tyr Glu Leu Ile Val Val Ser Pro Met Thr Ile	
675 680 685	
cta ccc tgg gag tcg atc gca ttt gca ccc ata gga tta gta aac atg	2350
Leu Pro Trp Glu Ser Ile Ala Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met	

690	695	700	705	
ctc aac gcc gga ggg gca gtc aag tct ttg gac atc agt gag gat aat				2398
Leu Asn Ala Gly Gly Ala Val Lys Ser Leu Asp Ile Ser Glu Asp Asn				
	710	715	720	
gag gat aag atg gtt cag gtt ggt att aaa ggg gcc gga gaa atg atg				2446
Glu Asp Lys Met Val Gln Val Gly Ile Lys Gly Ala Gly Glu Met Met				
	725	730	735	
gtt tat tca tca gaa aag cca aaa gcg tgt aga gtt aat gga gaa gac				2494
Val Tyr Ser Ser Glu Lys Pro Lys Ala Cys Arg Val Asn Gly Glu Asp				
	740	745	750	
atg gag ttt gag tat gaa gag agc atg att aag gtt caa gtt aca tgg				2542
Met Glu Phe Glu Tyr Glu Glu Ser Met Ile Lys Val Gln Val Thr Trp				
	755	760	765	
aac cat aac tca ggt ggt ttt acc act gtt gag tac tta ttt tga gcttg				2592
Asn His Asn Ser Gly Gly Phe Thr Thr Val Glu Tyr Leu Phe				
	770	775	780	
aagctaattct aagtcctttac ttaatgagtg atgtaactga gtagttgact tgagagtaca				2652
gtatgtgtga agcttattat tccaaaaaaaa aaaaaaaaa				2690

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、塩基配列にコードされるアミノ酸の対応を示すコドン表である。コドンは、'5-末端が左側にくるように示し、mRNAにおける塩基配列を示している。UはRNAにおけるウラシル塩基を示しており、DNAにおいてはチミン塩基に相当する。

【書類名】

図面

【図1】

Phe	UUU	Ser	UCU UCC	UAU UAC	UGU UGC
	UUC				
Leu	UUA	Pro	CCU CCC CCA CCG	UAA UAG	Stop
	UUG				UGA
	CUU			CAU CAC	CGU CGC
	CUC				
Ile	CUA	Thr	ACU ACC ACA ACG	CAA CAG	Arg CGA CGG
	CUG				
	AUU			AAU AAC	Ser AGU AGC
Met	AUC	Ala	GCU GCC GCA GCG	AAA AAG	Arg AGA AGG
	AUA				
Val	AUG	Gly	GAU GAC GAA GAG	GGU GGC GGA GGG	
	GUU				
	GUC				
	GUA				
	GUG				

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

植物におけるラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させる技術に利用可能なラフィノース合成酵素遺伝子等を提供すること

【解決手段】

配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号236から2584までの塩基で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する蛋白質をコードするDNAからなるラフィノース合成酵素遺伝子。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100093285

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内

【氏名又は名称】 久保山 隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内

【氏名又は名称】 神野 直美

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社